

高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测试盒说明书

(货号: BC029 微板法 96T)

测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

一、试剂组成及配制

试剂组成	规格	组份	浓度	保存条件
R1	18mL×1瓶	3-吗啉丙磺酸	50mmol/L	2~8℃ 避光保存
		N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3-甲基苯胺	1mmol/L	
		氯化镁.6合水	15mmol/L	
		胆固醇氧化酶	≥3KU	
		过氧化物酶	≥5KU	
R2	6mL×1瓶	3-吗啉丙磺酸	50mmol/L	
		4-氨基安替比林	0.2mmol/L	
		氯化镁.6合水	15mmol/L	
		胆固醇酯酶	≥3KU	
		吐温-20	0.1%	
校准品	粉剂×1支	胆固醇	见标签	
校准品配制: 临用前一只粉剂加入200μL双蒸水溶解后备用。				
附送96孔平底酶标板一块				室温放置

二、测定原理:

反应分两步进行,试剂1中具有特异选择性的强离子缓冲液与表面活性剂作用于血清中脂蛋白(CM、VLDL、LDL),使其所含的胆固醇暴露,在胆固醇酯酶盒胆固醇氧化酶的催化下生成过氧化氢,过氧化氢倍过氧化氢酶而倍清除。试剂2中的叠氮钠抑制了过氧化氢酶活性,另一表面活性剂使高密度脂蛋白胆固醇颗粒中的胆固醇暴露,并与胆固醇酯酶试剂发生反应,通过Trinder反应可测定高密度脂蛋白胆固醇。

三、操作过程:

1、样本处理:

①、血清(浆):直接测定,如超过线性范围用生理盐水稀释后测定。

②、培养液样本:吸取培养液,1000转/分,离心10分钟,取上清测定。[注]:一般建议细胞密度在100万个/mL以上。

③、组织样本:准确称取组织重量,按重量(g):体积(mL)=1:9的比例,加入9倍体积的匀浆介质,冰水浴条件下机械匀浆,2500转/分,离心10分钟,取上清液待测。[注]:如组织样本为非高脂样本,匀浆介质统一用磷酸盐缓冲液(0.1mol/L pH 7.4)或生理盐水进行提取;如组织样本为高脂样本或部分为高脂样本,匀浆介质可统一用无水乙醇进行提取。

④、细胞样本:

A、细胞收集:将制备好的细胞悬液取出,1000转/分,离心10分钟,弃上清液,留细胞沉淀;用等渗缓冲液(推荐0.1mol/L、pH7~7.4磷酸盐缓冲液)清洗1~2次,同样1000转/分,离心10分钟,弃上清液,留细胞沉淀;

B、细胞破碎:加入0.2~0.3mL的匀浆介质(推荐0.1mol/L、pH7~7.4磷酸盐缓冲液或生理盐水)进行匀浆,冰水浴条件下超声破碎(功率:300W,3~5秒/次,间隔30秒,重复3~5次)或手动匀浆,制备好的匀浆液不离心待测。也可采用裂解液裂解(推荐TritonX-100,1~2%,裂解30~40分钟),裂解好的液体不离心直接测定。[注]:建议细胞密度在100万个/mL以上。破碎好的液体可显微镜观察细胞是否破碎完全

2、操作表:

酶标仪操作			
	空白管	校准管	样本管
蒸馏水(μL)	2.5		
校准品(μL)		2.5	
样本(μL)			2.5
试剂一(μL)	180	180	180
混匀,37°C孵育5分钟,波长600nm,酶标仪测定各管吸光度值A1			
试剂二(μL)	60	60	60
混匀,37°C孵育5-10分钟,波长600nm,测定各管吸光度值A2,计算ΔA=A2-A1。			

全自动生化分析仪上机操作			
样本/校准品/水	Sample Volume	μL	2.5
R1	Reagent	μL	180
37°C孵育5分钟,波长600nm,测定光吸收值A1			
R2	Reagent	μL	60
37°C孵育5分钟,波长600nm,测定光吸收值A2			
主波长	Main wavelength	nm	600
反应类型	Reaction type		两点终点法
反应方向	Reaction direction		升反应(+)

四、计算公式及举例:

1、血清等液体样本计算公式:

$$\text{HDLc含量 (mmol/L)} = \frac{\Delta A_{\text{样本}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}} \times C_{\text{校准}}$$

$C_{\text{标准}}$:标准品浓度,mmol/L。

例1:取正常人血浆10μL,按操作表操作,得空白管吸光度A1为0.000,空白管吸光度A2为0.010,ΔA空白为0.010;校准管吸光度A1为0.048,校准管吸光度A2为0.139,则ΔA校准为0.091;样本管吸光度A1为0.042,样本管吸光度A2为0.088,则ΔA样本为0.046;则计算如下:

$$\text{HDLc含量 (mmol/L)} = \frac{0.046 - 0.010}{0.091 - 0.010} \times 1.8 = 0.80 \text{ mmol/L}$$

例2:取大鼠血清10μL,按操作表操作,得空白管吸光度A1为0.000,空白管吸光度A2为0.010,ΔA空白为0.010;校准管吸光度A1为0.048,校准管吸光度A2为0.139,则ΔA校准为0.091;样本管吸光度A1为0.010,样本管吸光度A2为0.048,则ΔA样本为0.038;则计算如下:

$$\text{HDLc含量 (mmol/L)} = \frac{0.048 - 0.010}{0.091 - 0.010} \times 1.8 = 0.2667 \text{ mmol/L}$$

2、组织、细胞样本计算公式:

①、用PBS或生理盐水作匀浆介质提取样本计算方法（此方法需要另外测定匀浆液蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本所有售，货号为A045-2或者A045-4）：

$$\text{HDLc含量 (mmol/gprot)} = \frac{\Delta A_{\text{样本}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

注:Cpr为匀浆液蛋白浓度, gprot/L (prot指蛋白)

②、用无水乙醇作匀浆介质提取样本计算方法（此方法不需要另外测定匀浆液蛋白浓度）：

$$\text{HDLc含量 (mmol/g组织)} = \frac{\Delta A_{\text{样本}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{W}{V_{\text{乙醇}}}$$

$V_{\text{乙醇}}$: 样本提取时加入的乙醇的总体积, L。

注: 细胞样本测定时可将上式中的 $\frac{W}{V_{\text{乙醇}}}$ 替换为细胞前处理时的细胞密度 (10^6 个/L)。

例1: 取10%小鼠肝匀浆10 μ L, 按操作表操作, 得空白管吸光度A1为0.000, 空白管吸光度A2为0.010, ΔA 空白为0.010; 校准管吸光度A1为0.048, 校准管吸光度A2为0.139, 则 ΔA 校准为0.091; 样本管吸光度A1为0.040, 样本管吸光度A2为0.066, 则 ΔA 样本为0.022; 同时测得10%小鼠肝匀浆蛋白浓度为12.0121gprot/L, 计算如下:

$$\begin{aligned} \text{HDLc含量 (mmol/gprot)} &= \frac{0.022 - 0.010}{0.091 - 0.010} \times 1.8 \div 12.0121 \\ &= 0.0296 \text{ mmol/gprot} \end{aligned}$$

五、性能指标:

- 1、试剂空白管吸光度 ≤ 0.05 。
- 2、线性范围: 0.09 ~ 2.5 mmol/L, $r^2 > 0.990$ 。
- 3、灵敏度: 测试1.00mmol/L被测物时, 吸光度值 ΔA 大于0.04。
- 4、准确度: 相对偏差 $\leq 10\%$ 。
- 5、精密性: $CV \leq 3\%$, 批间相对极差 $\leq 5\%$ 。
- 6、稳定性: 原包装试剂盒在2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C避光保存, 有效期为12个月。开启后2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C避光保存, 可稳定一个月。

六、注意事项:

- 1、本产品仅用于科研, 不得用于临床诊断, 切勿服用。
- 2、样品含量如超出检测范围上限时, 可用生理盐水稀释样本后进行测定, 测定结果乘以稀释倍数。
- 3、试剂防止葡萄糖、胆固醇等试剂的污染。
- 4、试剂与样本量可按照仪器要求, 按比例增减。
- 5、样本中HDL-C含量较低时, 可以加大样本取样量 (如取10 μ L或20 μ L, 同时标准品需要稀释相应的倍数后和样本取样量一致, 试剂一, 二不变) 后测定。
- 6、标准品粉剂为冻干粉, 溶解时间较长, 配置时可提前半小时配制。

七、参考值:

大鼠血浆：0.45±0.16mmol/L

小鼠血浆：0.92±0.11 mmol/L

鸡血浆：0.36±0.12（某些种类的能达到2.33±0.38）mmol/L

鱼血浆：0.99±0.22 mmol/L

小鼠肝脏：12.4±2.0 μmol/gprot

鱼肝脏：39.36±12.37μmol/gprot

注：以上值仅供参考，并无临床学意义。